

Penentuan Waktu Optimum Produksi Bakteriosin dari *Lactobacillus brevis* Terhadap Bakteri Patogen *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Uswatun Hasanah^{1,*}, Rafika Sari^{2,*},Pratiwi Apridamayanti^{3,*}

Universitas Tanjungpura

Pontianak, Indonesia, uus081115@gmail.com

ABSTRAK

Latar belakang penelitian ini adalah bakteriosin yang dihasilkan bakteri asam laktat sangat potensial digunakan sebagai pengawet makanan alami, karena dapat mengendalikan beberapa bakteri kontaminan, memperpanjang waktu penyimpanan dan meningkatkan keamanan pangan tanpa membahayakan kesehatan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh waktu inkubasi pada kurva pertumbuhan terhadap produksi bakteriosin dari *Lactobacillus brevis* dan optimasi waktu produksi bakteriosin yang dihasilkan bakteri *Lactobacillus brevis* terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Kurva pertumbuhan ditentukan dengan mengukur suspensi bakteri menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 537,50 nm dan uji aktivitas dilakukan dengan metode difusi cakram. Hasil penelitian *Lactobacillus brevis* mengalami empat fase pertumbuhan selama 48 jam, yaitu fase lag pada jam ke 0-8 jam, fase log pada jam ke 12-24 jam, fase stationer pada jam ke 26-32, dan fase kematian pada jam ke 34-48 jam. Waktu produksi optimum diidentifikasi sebagai waktu bagi *Lactobacillus brevis* dalam memproduksi senyawa antimikroba bakteriosin secara optimal, yang ditandai dengan besarnya zona bening yang terbentuk disekitar cakram. Kesimpulan penelitian ini yaitu produksi bakteriosin dari *Lactobacillus brevis* optimum pada waktu inkubasi jam ke 32, dimana diperoleh absorbansi tertinggi dengan rata-rata 0,24489 A dan terbentuk zona bening terbesar dengan rata-rata 13,55 mm pada *Staphylococcus aureus* dan 10,85 mm pada *Escherichia coli*.

Kata kunci: Bakteriosin, *Escherichia coli*, *Lactobacillus brevis*, Spektrofotometer UV-Vis, *Staphylococcus aureus*.

**Determination of Optimum Time of Bacteriocin Production from
Lactobacillus brevis to Pathogen Bacteria *Staphylococcus aureus* and
*Escherichia coli***

Uswatun Hasanah^{1,*}, Rafika Sari^{2,*},Pratiwi Apridamayanti^{3,*}

Universitas Tanjungpura
Pontianak, Indonesia, uus081115@gmail.com

ABSTRACT

The background of this study was *Lactobacillus plantarum* is a lactic acid bacterium that produces secondary metabolites in the form of bacteriocins which are beneficial in the health field as antimicrobials and food products. The purpose of this study was to determine the optimum bacteriocin production time of *L. plantarum* based on the growth curve and its inhibitory activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The method used is the growth curve analysis based on the relationship of the absorbance of bacteriocin samples measured by UV-Vis spectrophotometer wave length at 777 nm and incubation time from 0 to 48 hours and disc diffusion based on the size of the clear zone formed around the paper which contains bacteriocin from *L. plantarum* in the log phase until stationary phase of pathogenic bacteria *S. aureus* and *E. coli*. The results showed 32 hours is the optimum production time for bacteriocins, which is the largest absorbance of 0.3215 and clear zone is formed with the largest diameter of 11.28 mm against *S. aureus* and 8.37 mm against *E. coli*. The result of ANOVA test that significance value <0.05. The conclusion of this study is that *L. plantarum* have four growth phases for 48 hours, that is lag phase at 0-4 hours, log phase at 4-30 hours, and stationary phase at 30-36 hours then the death phase and bacteriocin have activity of bacterial to *S. aureus* and *E. coli* from 24 hours until 36 hours and 28 hours is the optimum activity.

Keywords: Bacteriocin, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus*, UV-Vis spectrophotometer.

Pendahuluan

Salah satu masalah yang muncul menyangkut makanan dan minuman adalah masalah keamanannya. Makanan dan minuman yang tidak aman dapat disebabkan oleh cemaran mikroba sehingga dapat mendatangkan penyakit gangguan pencernaan, keracunan makanan, dan penyakit yang ditularkan melalui makanan (*food borne disease*) salah satunya penyakit diare.⁽¹⁾ *World Health Organization* (WHO) dan *United Nations Emergency Children's Fund* (UNICEF) menyatakan bahwa ada sekitar dua miliar kasus diare diseluruh dunia setiap tahun, dan 1,9 juta anak balita meninggal akibat diare setiap tahunnya.⁽²⁾

Bakteriosin merupakan produk metabolit sekunder dari bakteri asam laktat (BAL) yang berpotensi sebagai bahan pengawet alami (biopreservatif).⁽³⁾

Produksi optimum bakteriosin dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu suhu, pH, media, Fase pertumbuhan dan waktu

inkubasi.⁽⁴⁾ Oleh karena itu, untuk mengetahui pengaruh waktu inkubasi terhadap kurva pertumbuhan bakteriosin dan untuk memaksimalkan aktivitas maka perlu dilakukan optimasi waktu produksi bakteriosin dari *Lactobacillus brevis* terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur (pyrex), cawan petri (Iwaki pyrex), kawat ose, timbangan, tabung reaksi, erlemeyer (pyrex), gelas beaker (Iwaki pyrex), autoklaf, inkubator, Laminar Air Flow (LAF), bunsen, lemari pendingin, mikrosentrifugasi berpendingin, filter bakteri, jangka sorong, pH meter, hotplate, mikropipet, digital vortex mixer, magnetic stirrer, kertas cakram, kuvet, spektrofotometer UV-Vis. Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah isolat *Lactobacillus plantarum* dari ce hun tiaw, media De Man Rogosa and Sharpe (MRS)

Agar (Merck), De Man Rogosa and Sharpe (MRS) Broth (Merck), aquadest, NaCl 0,9%, alkohol 70%, Larutan standar *Mc Farland*, NaOH(Merck) 0,1 N dan media Mueller Hinton Agar (MHA).

Jalannya Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Laboratorium Biologi Farmasi Badan Pengelola Fakultas Farmasi Universitas Tanjungpura Pontianak selama bulan November 2018 – April 2019.

1. Sterilisasi Alat dan Bahan serta pembuatan media

Sterilisasi alat dan bahan dilakukan sebelum digunakan untuk mencegah terjadinya kontaminasi yang dapat berpengaruh terhadap hasil dari penelitian. Cara sterilisasi dilakukan dengan cara alat yang ada lubang seperti gelas ukur, tabung reaksi, dan erlemeyer ditutup dengan kapas yang dibungkus dengan kain kasa hingga tertutup rapat. Alat-alat dibungkus menggunakan kertas merang dan diikat. Kemudian masukkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 120°C dan tekanan 1 atm. Alat yang tidak tahan panas tinggi disterilisasi dengan zat kimia

berupa alkohol 70%. Sedangkan untuk jarum ose di sterilisasi dengan cara di panaskan pada nyala api. Sterilisasi bahan dilakukan dengan cara ditutup kembali wadah yang digunakan ,dimasukkan ke autoklaf selama 15 menit pada suhu 120°C dan tekanan 1 atm.⁽⁵⁾Sebanyak 68,2 g MRS agar ditimbang dalam erlemeyer dalam 1 liter akuades. Larutan dihomogenkan dengan magnetik stirer, dilakukan sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, tekanan 1 atm. Kemudian medium didinginkan pada suhu ruang kemudian dituangkan di dalam petri untuk membuat media MRSA sedangkan untuk membuat media MRSB dengan mengambil media sebanyak 52,2 gram dalam 1 liter aquades kemudian dihomogenkan dengan magnetik stirer dan homogen kemudian disterilisasi dengan autoklaf 121°C selama 15 menit dan dibiarkan pada suhu ruang hingga dingin.⁽⁶⁾

2. Produksi bakteriosin dari *L.brevis*

Isolat *Lactobacillus brevis* ditumbuhkan pada media De Man Rogosa Sharp Agar (MRSA) dengan

metode gores kemudian diinkubasi pada suhu 32°C selama 48 jam, kemudian diambil dua koloni bakteri asam laktat dan dimasukkan ke 5 ml De Man Rogosa Sharp Broth (MRSB). Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 32°C selama 48 jam.⁽¹⁰⁾ Selanjutnya 9 mL media MRS Broth steril diinokulasi 1 mL kultur primer *Lactobacillus plantarum*, selanjutnya diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 32°C. Dishaker dengan kecepatan 1200 rpm.⁽⁶⁾ Kultur kerja hasil inkubasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C untuk memperoleh supernatan bebas sel. Proses sentrifugasi menghasilkan cairan dua fase yaitu supernatan dan endapan. Supernatan kemudian dipisahkan dengan cara disaring dengan filter bakteri, dan kemudian dinetralkan pH nya menjadi pH 7,0 dengan NaOH 1M.⁽⁶⁾ Pengamatan pertumbuhan bakteri dilakukan setiap empat jam pada fase lag, log dan kematian, serta setiap dua jam pada fase sationer. Disiapkan larutan blanko yaitu aquades kemudian sampel supernatant bakteriosin yang telah dimurnikan, ditentukan panjang

gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang visible 400-800 nm. Hubungan antara absorbansi dan waktu inkubasi dinyatakan sebagai kurva pertumbuhan.⁽⁷⁾

3. Uji Aktivitas Bakteriosin Terhadap Bakteri Patogen

Kultur stok *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* masing-masing ditumbuhkan dalam 15 ml media MHA pada petri yang berbeda, kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.⁽⁶⁾ Kertas cakram steril yang dibuat dari kertas saring Whatman dengan diameter ± 6 mm direndam ke dalam 50 μ L larutan uji selama 30 menit. Dalam hal ini larutan uji merupakan supernatan bebas sel yang diperoleh dari hasil sentrifugasi kultur kerja *Lactobacillus brevis* Kertas cakram diletakkan di atas seluruh medium Mueller Hilton Agar (MHA) yang sebelumnya telah diinokulasi *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram diukur

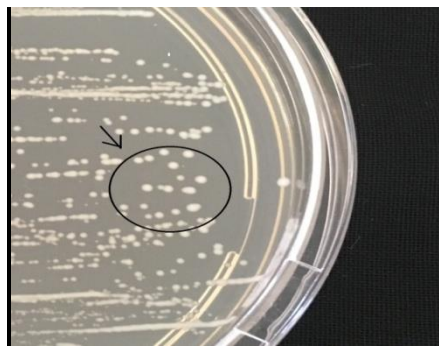
diameternya menggunakan jangka sorong.⁽⁹⁾

8. Analisis Data

Data yang diperoleh berupa diameter zona hambat dari *Lactobacillus plantarum* terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang diukur menggunakan jangka sorong,

Hasil dan Pembahasan

1. Produksi Bakteriosin



Gambar 1. Bentuk Koloni *Lactobacillus brevis* pada media MRSA

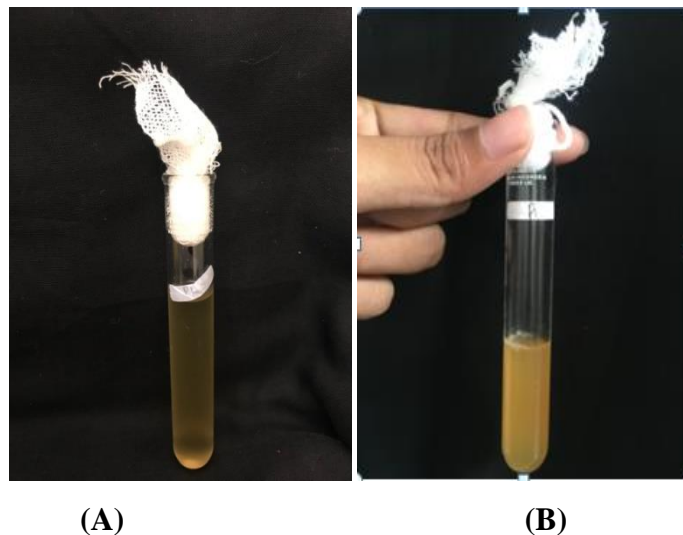
Secara makroskopik koloni tunggal *Lactobacillus brevis* berbentuk bulat, berwarna putih dan padat. Hal ini sesuai dengan ciri-ciri koloni *Lactobacillus plantarum* menurut Gilliland (1986) yaitu berbentuk bulat, licin, padat, serta berwarna putih atau kekuningan.⁽¹⁰⁾ Diambil 4-5 koloni tunggal kemudian diinokulasikan kedalam media MRSB (kultur primer) diinkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam.

serta waktu inkubasi bakteri *L. brevis* yang kemudian masing-masing data dianalisis dengan Statistical Program Service Solution (SPSS) menggunakan uji One Way ANOVA untuk melihat aktivitas antibakteri bakteriosin dari *L. plantarum* pada waktu optimum terhadap bakteri patogen *S. aureus* dan *E. coli*.

Kultur *Lactobacillus plantarum* didalam MRSB diinkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam. Menurut penelitian sebelumnya Sari (2018), suhu 32°C merupakan suhu optimum pertumbuhan *L. brevis*. Setelah diinkubasi 24 jam kultur cair primer akan berubah menjadi keruh akibat pelepasan antimikroba pada media tersebut.⁽¹⁰⁾ Kemudian dilakukan persiapan kultur sekunder dimana disiapkan sebanyak 9 mL media MRS Broth diinokulasi 1 mL kultur primer

Lactobacillus brevis selanjutnya diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 32°C. Divortex dengan kecepatan 1200 rpm.⁽⁶⁾ Kultur cair primer merupakan suspensi bakteri yang diperoleh dengan menginokulasikan 4 hingga 5 koloni *L.plantarum*. Namun karena diinokulasikan langsung dari koloni

L.brevis pada media MRSA sehingga masih terdapat koloni padat dari *L.brevis* oleh karena itu dilanjutkan dengan pembuatan kultur cair sekunder. Kultur cair sekunder merupakan suspensi bakteri yang diperoleh dengan mengambil 1 ml kultur cair primer yang kemudian ditambahkan pada 9 ml media MRSB.



Gambar 2. Kultur Cair Primer dan Kulur Cair Sekunder *L.plantarum*

Keterangan :

(A) Kultur cair primer *Lactobacillus brevis*

(B) Kultur cair sekunder *Lactobacillus brevis*

Dilakukan pemurnian bakteriosin, menurut BAL memproduksi bakteriosin optimum pada waktu inkubasi 24 jam dan waktu inkubasi maksimum adalah 48 jam karena pada waktu inkubasi yang lebih lama terjadi pembentukan dan aktifnya protease atau zat inaktivator lainnya yang dapat mengurangi aktivitas bakteriosin. Waktu maksimum dalam siklus pertumbuhan untuk memproduksi bakteriosin tergantung dari jenis bakteri dan dapat terjadi dari akhir fase log hingga fase stationer awal. Bakteriosin dapat tertahan dipermukaan atau didalam sel bakteri, sehingga diperlukan kondisi tertentu agar bakteriosin dilepaskan keluar dari sel bakteri dan dapat diproduksi secara maksimal.⁽¹³⁾ media MRSB yang telah mengandung bakteriosin selanjutnya divortex kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit menggunakan alat mikrosentrifugasi berpendingin. Sentrifugasi dilakukan pada suhu dingin untuk mencegah terjadinya denaturasi bakteriosin akibat suhu

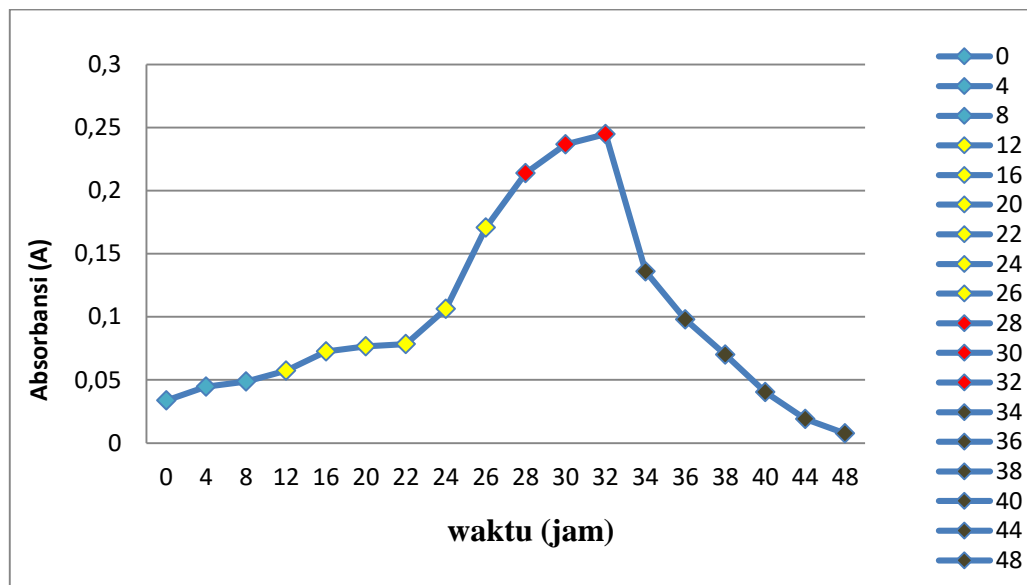
yang tinggi. Hasil sentrifugasi terdapat dua lapisan yaitu lapisan atas yang berwarna kuning jernih yang berisi bakteriosin dan lapisan bawah berupa padatan yang berisi sel bakteri.

Supernatan bebas sel setelah disentrifugasi diukur nilai pHnya dengan menggunakan pH meter dan didapat nilai pH awal bakteriosin asal *Lactobacillus brevis* pH 6. Hasil penelitian sesuai dengan penelitian Ogunbawo (2003) yang menyatakan bahwa *Lactobacillus brevis* OG1 stabil pada pH 2-8.⁽¹³⁾ Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa *Lactobacillus brevis* mempunyai aktivitas terbesar pada pH 6.⁽¹²⁾ Supernatan bebas sel memiliki pH asam disebabkan oleh adanya pengaruh asam-asam organik yang merupakan salah satu metabolit dari BAL. Supernatan dalam keadaan asam perlu dikondisikan pada keadaan netral yaitu pada pH 7 dengan penambahan NaOH 0,1N yang bertujuan untuk memastikan bahwa zona hambat yang terbentuk bukan berasal dari asam-asam

organik (asam laktat dan asam asetat) melainkan murni aktivitas dari bakteriosin. Filtrat yang telah dinetralkan kemudian disterilkan dengan filter bakteri berdiameter 0,22 μm yang bertujuan untuk membebaskan supernatan dari sel-sel bakteri yang tersisa dikarenakan sel bakteri yang tersisa dapat mengkontaminasi supernatan yang dihasilkan. Bakteriosin yang dihasilkan kemudian diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan diuji aktivitas terhadap bakteri patogen *S.aureus* dan *E.coli*.

2. Penentuan Kurva Pertumbuhan
Kurva pertumbuhan bakteri *Lactobacillus brevis* digunakan untuk menentukan waktu inkubasi selama produksi senyawa antimikroba bakteriosin. Analisis kurva ditentukan berdasarkan kekeruhan suspensi isolat *Lactobacillus brevis* selama 48 jam dengan pengamatan setiap empat jam pada fase lag, eskponensial dan kematian serta setiap dua jam pada

fase stationer menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 537,50 nm. Kekeruhan larutan sampel menunjukkan banyaknya bakteriosin. Hal ini dikarenakan sampel sel mikroba dengan tingkat kekeruhan tertentu akan menentukan jumlah cahaya yang diserap (terabsorpsi) yang dibaca dalam bentuk absorbansi. Semakin keruh suspensi bakteri maka semakin banyak jumlah sel yang tumbuh ditandai dengan meningkatnya nilai absorbansi yang dihasilkan. Adapun panjang gelombang di peroleh dengan cara melakukan skrining panjang gelombang serapan maksimum pada rentang 300-650 nm. Hasil skrining didapat panjang gelombang maksimum 537,50 nm. Hal ini sesuai dengan penelitian Kusmawati (2013) yang menyatakan bahwa bakteriosin dari BAL dapat dilakukan analisis menggunakan spektrofotometri visible. Kurva pertumbuhan bakteri *L.brevis* dapat dilihat pada (Gambar 3).



Keterangan:

----- = Fase lag ----- = Fase log
----- = Fase stationer ----- = Fase kematian

Gambar 3. Kurva Pertumbuhan Bakteriosin dari *Lactobacillus brevis*

Berdasarkan gambar diatas, kurva pertumbuhan *L.brevis* terdiri dari fase lag, fase eksponensial, fase stationer dan fase kematian. Fase lag *L.brevis* terjadi pada jam ke-0 sampai jam ke-8 dimana dapat diamati hubungan antara waktu inkubasi dan nilai absorbansi pada **gambar 3** kemudian dilakukan analisis dengan uji statistik dengan software (SPSS) menggunakan Anova pada data tersebut. Dari hasil analisis SPSS yang dilakukan pada jam ke 0 hingga jam ke 32 untuk mengamati perbedaan signifikan sebagai penentuan pembagian antara fase lag

dan fase log dan stationer. Dihasilkan data uji normalitas yaitu nilai sig >0,05 yang berarti data terdistribusi normal, kemudian uji homogenitas nilai sig >0,05 yang berarti data terdistribusi homogen kemudian hasil uji Anova nilai sig <0,05 yang berarti perbedaan waktu inkubasi berpengaruh signifikan terhadap nilai absorbansi, kemudian pada uji Post-Hoc didapatkan jam ke 0 sampai jam ke 8 tidak berbeda signifikan, yang berarti jam ke-0 sampai jam ke-8 merupakan waktu adaptasi mikroba dengan lingkungannya. Penelitian Khoiriyah

(2014) Fase lag *Lactobcillus* sp. RED4 terjadi pada jam ke-0 sampai jam ke-2.⁽⁹⁾ Pada fase lag bakteri melakukan proses adaptasi terhadap kondisi lingkungannya. Menurut Fardiaz, lamanya fase adaptasi ditentukan oleh beberapa faktor salah satunya yaitu kondisi media yang digunakan.⁽¹⁴⁾ Dari hasil statistik yang telah dilakukan dapat dilihat pada **gambar 3**, pada uji Post-Hoc didapatkan jam ke 0 hingga jam ke 8 berbeda bermakna dengan jam ke 12, 14, 16, 20, 22, 24, dan 26. Sehingga dapat disimpulkan bahwa jam ke 12 hingga jam ke 26 merupakan fase log. Pada fase ini suatu jenis mikroba memperbanyak diri dengan cara membelah diri menjadi dua, kemudian masing-masing membelah lagi menjadi dua sehingga pada setiap generasi jumlahnya menjadi dua kali populasi sebelumnya, pertumbuhan bakteri berlangsung sangat cepat.⁽¹⁶⁾ Pada fase stationer yang dimulai pada jam ke 28 sampai jam ke 32 karena dapat diamati pada kurva pertumbuhan **gambar 3** dimana pada jam ke 28 hingga jam ke 32 memiliki perbedaan nilai absorbansi yang

tidak berbeda signifikan sehingga pada jam ke 32 masih merupakan fase stationer serta masih didapatkan aktivitas bakteriosin yang paling besar pada jam ke 32 pada saat diuji aktivitas antibakteri. Pada fase ini tidak terjadi penambahan jumlah bakteri jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati karena cadangan makanan sudah mulai menipis dan pada fase ini BAL akan menghasilkan metabolit sekunder sebagai pertahanan diri terhadap lingkungannya dan mikroorganisme lain. Menurut Jimenez Diaz (1993) produksi bakteriosin terbaik pada saat mencapai akhir fase eksponensial atau awal fase stationer.⁽¹⁵⁾ Fase kematian dimulai dari jam ke-34 hingga jam ke-48 dapat diamati pada kurva pertumbuhan **gambar 3** terdapat perbedaan yang signifikan antara nilai absorbansi pada jam ke 32 dengan jam ke 34, kemudian bakteriosin sudah tidak memiliki aktivitas pada jam ke 40 pada uji aktivitas antibakteri. Pada fase ini, terjadi kematian *L.brevis* karena berkurangnya jumlah makanan dan nutrisi dalam media serta cadangan

energi dalam sel mulai menipis sehingga bakteriosin semakin menurun. Hasil yang diperoleh sedikit berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Khoiriyah (2014) fase eksponensial terjadi pada jam ke-2 sampai jam ke-16, fase stationer terjadi mulai jam ke-16 sampai jam ke-24.⁽⁹⁾ Perbedaan ini terjadi akibat perbedaan perlakuan, isolasi yang digunakan, bakteri yang digunakan serta kondisi lingkungan yang berbeda.

Berdasarkan hasil analisis kurva pertumbuhan menunjukkan bahwa pada awal fase stasioner, bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus brevis* memiliki nilai absorbansi yang rendah kemudian membentuk pola yang cenderung naik hingga mencapai titik optimum. Absorbansi bakteriosin mencapai optimum pada jam ke-32 dengan nilai rata-rata 0,24489 A. Dengan bertambahnya waktu inkubasi, nilai absorbansi yang diperoleh menunjukkan hasil yang cenderung menurun hingga akhir fase kematian. Hal ini dikarenakan waktu inkubasi berhubungan dengan nutrisi, pH media dan suhu yang merupakan

faktor kritis suatu bakteri dalam menghasilkan bakteriosin. Meningkatnya waktu inkubasi akan menyebabkan nutrisi dalam media menjadi menipis dan pH menjadi sangat asam karena terjadi produksi asam-asam organik dalam jumlah besar, sehingga aktivitas bakteriosin menjadi cenderung menurun.

3. Uji aktivitas Bakteriosin dari *Lactobacillus brevis* terhadap Bakteri Patogen *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Uji aktivitas bakteriosin terhadap *staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimikroba dari bakteriosin dalam menghambat bakteri patogen. Uji dilakukan dengan metode difusi cakram. Uji aktivitas dilakukan setiap dua jam sekali pada fase stationer. Adapun zona hambat yang terbentuk dapat dilihat pada tabel berikut :

Waktu inkubasi (jam)	Diameter zona hambat (mm) $\bar{X} \pm SD$	
	Staphylococcus aureus	Escherichia coli
24	0 \pm 0	0 \pm 0
26	6,516 \pm 0,202	6,45 \pm 0,229
28	7,3 \pm 0,36	7,216 \pm 0,125
30	12,83 \pm 0,305	9,383 \pm 0,368
32	13,55 \pm 0,327	10,85 \pm 0,15
34	6,75 \pm 0,132	6,716 \pm 0,175
36	6,483 \pm 0,275	6,466 \pm 0,202
38	6,216 \pm 0,125	6,203 \pm 0,100
40	0 \pm 0	0 \pm 0

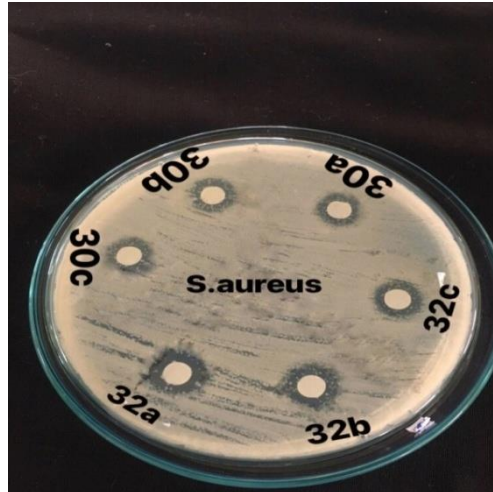
Tabel 1. Diameter zona hambat
banteriosin

Keterangan: X = rata-rata

SD = Standar Deviasi

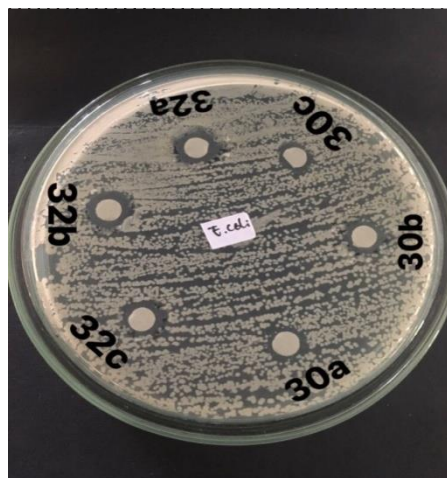
Hasil pengamatan uji aktivitas antimikroba menunjukkan *L.brevis* memiliki zona hambat yang lebih besar pada bakteri Gram positif dibandingkan bakteri Gram negatif dapat dilihat pada tabel 1. Hal ini dikarenakan penghambatan bakteriosin terhadap kedua bakteri mempunyai mekanisme yang berbeda. Perbedaan mekanisme penghambatan pada bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif mengakibatkan perbedaan zona hambat yang terbentuk dimana bakteri bakteri Gram negatif memiliki ketahanan yang lebih baik terhadap senyawa antimikroba sehingga zona hambat yang terbentuk pada bakteri Gram negatif lebih kecil dari penghambatan bakteri Gram positif.

Optimasi aktivitas bakteriosin terhadap waktu inkubasi bertujuan untuk mengetahui waktu bakteriosin diproduksi optimal yang ditandai dengan besarnya zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram pada semua mikroba uji. Adapun diameter zona hambat bakteri *S.aureus* dan *E.coli* dapat dilihat pada grafik pada **gambar 4-5**.



Gambar 4. Zona Hambat Bakteriosin dari *L. brevis* terhadap *Staphylococcus aureus*

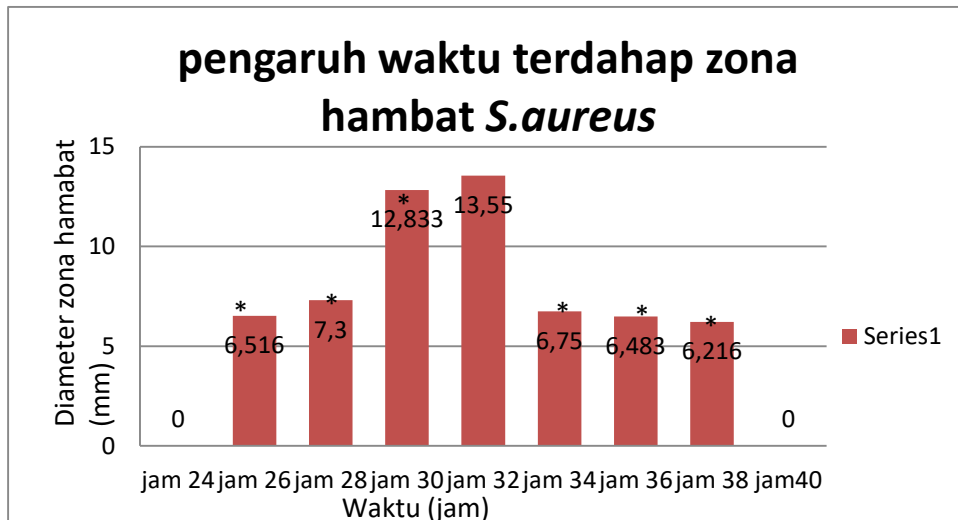
Keterangan : 30A, 30B, dan 30C merupakan aktivitas antibakteri supernatan bakteriosin dari *L. brevis* pada jam ke 30 terhadap *S. aureus* yang dilakukan triplo; 32A, 32B, 32C merupakan aktivitas antibakteri supernatan bakteriosin dari *L. brevis* pada jam ke 32 terhadap *S. aureus* yang dilakukan triplo. Pada jam ke 32 didapatkan rata-rata zona hambat terbesar yaitu sebesar 13,85 mm.



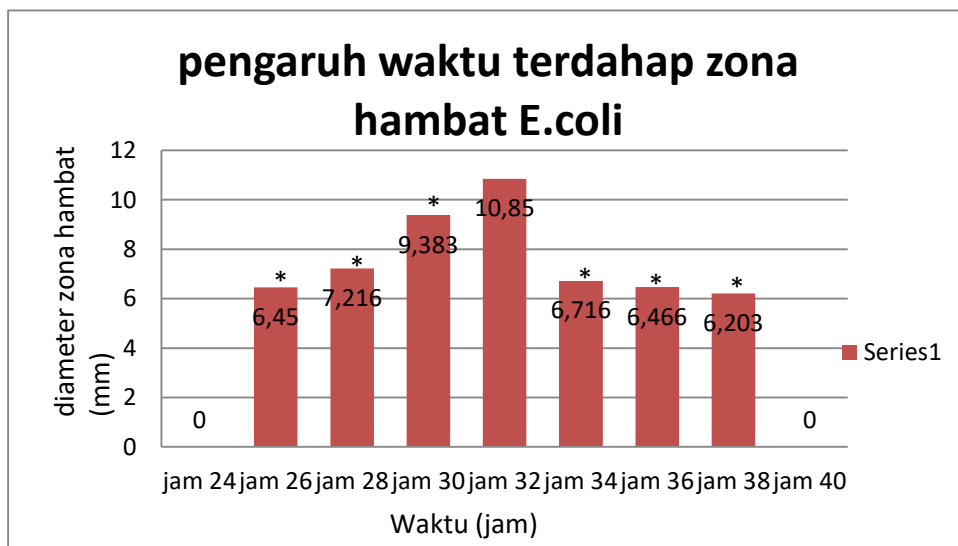
Gambar 5 . Zona Hambat Bakteriosin dari *L. brevis*. terhadap *Escherichia coli*.

Keterangan : 30A, 30B, dan 30C merupakan aktivitas antibakteri supernatan bakteriosin dari *L. brevis* pada jam ke 30 terhadap *E. coli* yang dilakukan triplo; 32A, 32B, 32C merupakan aktivitas antibakteri supernatan bakteriosin dari *L. brevis* pada jam ke 32 terhadap *E. coli* yang dilakukan triplo. Pada jam ke 32 didapatkan rata-rata zona hambat terbesar yaitu sebesar 10,85mm.

Adapun diameter zona hambat yang terbentuk dapat dilihat dilihat pada grafik pada gambar 0s .



Gambar 6. Grafik Diameter Zona Hambat Bakteriosin dari *Lactobacillus brevis* Terhadap *Staphylococcus aureus*



Gambar 7. Grafik Diameter Zona Hambat Bakteriosin dari *Lactobacillus brevis* terhadap *Escherichia coli*

Berdasarkan hasil tersebut terlihat bahwa bakteriosin *L.brevis* menunjukkan aktivitas optimum terhadap bakteri *S.aureus* dan *E.coli* pada jam ke 32 dengan rata-rata nilai absorbansi sebesar 0,24489 A,

dengan ditandai zona hambat paling besar dengan rata rata *S.aureus* 13,55 mm dan *E.coli* 10,85 mm. Diameter antimikroba yang dihasilkan oleh *L.brevis* dapat dikategorikan kuat dapat dilihat pada lampiran 3. Hal ini sesuai dengan penelitian

sebelumnya, bahwa selain pH dan pemanasan, fase pertumbuhan dan waktu inkubasi juga dapat mempengaruhi optimasi produksi bakteriosin.

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya ditemukan galur bakteri asam laktat yaitu *Lactobacillus brevis* yang diisolasi dari es pisang hijau dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* mempunyai aktivitas tertinggi setelah diproduksi pada suhu 40°C dan pada pH optimum produksi pada pH 6. Hasil uji statistik yang terlampir pada **Lampiran 5**. Data nilai diameter zona hambat terhadap bakteri *S.aureus* dan *E.coli* terlebih dahulu diuji normalitas Shapiro-Wilk menunjukkan setiap kelompok memiliki data signifikan $>0,05$ maka dari hasil uji ini didapatkan bahwa data terdistribusi normal. Kemudian di uji homogenitas data didapatkan hasil data terdistribusi merata dengan nilai homogenitas $>0,05$. Selanjutnya dengan uji ANOVA didapat nilai signifikansi 0,000 yang menunjukkan terdapat perbedaan bermakna pada waktu inkubasi.

Selanjutnya dianalisis menggunakan Post Hoc untuk melihat kelompok yang berbeda dengan syarat data harus normal dan terdistribusi secara homogen. Hasil yang didapat menyatakan bahwa waktu inkubasi jam ke-32 berbeda signifikan dengan waktu inkubasi yang lain yang berarti jam ke-32 merupakan waktu optimum bakteriosin.

Bakteriosin yang dihasilkan *Lactobacillus brevis* berpotensi dapat digunakan sebagai bahan biopreservasi pada produk pangan karena dari hasil yang telah dilakukan bakteriosin dapat menghambat bakteri kontaminan pada makanan yaitu *S.aureus* dan *E.coli* optimal pada jam ke 32 ditandai dengan zona hambat yang terbentuk paling besar pada kedua bakteri. Selain itu bakteriosin juga tahan terhadap pemanasan pada suhu 40-100°C yang merupakan salah satu karakteristik bakteriosin yang diperlukan sebagai agen biopreservasi pangan disebabkan umumnya proses produksi pangan menggunakan suhu pemanasan.⁽¹²⁾

Kesimpulan

1. Waktu inkubasi dapat mempengaruhi produksi bakteriosin yang dinyatakan dalam kurva pertumbuhan antara waktu inkubasi dan nilai absorbansi pada jam ke 0-8 jam merupakan fase log, fase lag pada jam ke 12-26 jam, fase stationer pada jam ke 28-32, dan fase kematian pada jam ke 34-48 jam.
2. bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus brevis* dapat menghambat *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan aktivitas tertinggi pada perlakuan inkubasi waktu produksi jam ke 32 dengan zona hambat 13,55 mm pada *Staphylococcus aureus* dan 10,85 mm pada *Escherichia coli*

Daftar Pustaka

1. Departemen Kesehatan R.I. Profil Kesehatan Indonesia. Jakarta: Pusat Data Kesehatan;1999.
2. MA, Arsin AA . Kontaminasi Bakteri *Escherichia Coli* Pada Botol Susu Dengan Kejadian Diare Pada Bayi. Jurnal Mkm.2014;146-153.
3. Reis JA, Paula A T, Casarotti S N, Penna A R B. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications Review Article. Food Eng Rev .2012;4:124–140.
4. Eliyani Y, Widanarni, Wahjuningrum D. Pemberian Probiotik *Lactobacillus brevis* dan Probiotik Oligosakarida pada Benih Patin Siam (*Pangasionodon hypophthalmus*) yang diinfeksi *Aeromonas hydrophilla*. 2013, 241-25.
5. Puspawati R , Adirestuti P , Anggreani G. Aktivitas Metabolit Bakteri *Lactobacillus plantarum* dan Peranannya dalam Menjaga Kesehatan Saluran Pencernaan. Konferensi Nasional Sains dan Aplikasinya. 2011.
6. Salminen, S. dan A. V. Wright. Lactic Acid Bacteria. New York: Marcel Dekker Inc;1993.
7. Duraisamy S, et al. Optimization of *Lactobacillus brevis* NS01 brevicin production and its application in apple juice biopreservation using food grade clarifying agent silica as a carrier. New York: Springer Science; 2015.
8. Cleveland J, Montville JT, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocin: safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology. 2001; 71:1-20.
9. Khoiriyah H , Ardiningsih P. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum terhadap Aktivitas

Bakteriosin *Lactobacillus* sp. RED4. JKK. 2014; 3 (4), 52-56.

Journal of Natural Sciences Research. 2014; 4(10): 137-146.

10. Usmiati S. Daging Tahan Simpan dengan Bakteriosin. Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian. 2012; 34(2): 12-14.
11. Drider D, Fimland G, He´chard Y, McMullen LM, Pre´vost H. The continuing story of class IIa bacteriocins. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2006; 70(2): 564–582.
12. Ningsi NP. Optimasi aktivitas bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus brevis* dari es pisang ijo (Skripsi). Pontianak: Universitas Tanjungpura; 2017. h35-42.
13. Hasan A and Wikandari P R. Penentuan Waktu Produksi Optimum Bakteriosin Asal *Lactobacillus plantarum* B1765 Berdasarkan Aktivitas Penghambatannya Terhadap *Staphylococcus Aureus*. UNESA Journal of Chemistry. 2018; 1(7):1-6.
14. Duraisamy S, et al. Optimization of *Lactobacillus brevis* NS01 brevicin production and its application in apple juice biopreservation using food grade clarifying agent silica as a carrier. New York: Springer Science; 2015.
15. Yelnetty A, Purnomo H, Purwadi, Mirah A. Biochemical Characteristics of Lactic Acid Bacteria with Proteolytic Activity and Capability as Starter Culture Isolated From Spontaneous Fermented Local Goat Milk.
16. Aliya H, Maslakah N, Numrapi T, Buana AP, Hasri YN. Pemanfaatan Asam Laktat Hasil Fermentasi Limbah Kubis Sebagai Pengawet Anggur dan Stoberi. Bioedukasi. 2015; 9(1): 23-28.